华北大黑鳃金龟两种围食膜蛋白 cDNA 的分子克隆与序列分析

周洪旭[1,2], 谭秀梅[2],李长友[2],王俊平[2],
孙绪艮[1,*],郭 巍[3],李国勋[2,*]
(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; 2. 青岛农业大学植物保护学院, 山东青岛 266109;
3. 河北农业大学,河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心, 河北保定 071000)

摘要: 本文以华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 中肠为材料,依据 Stratagene 公司文库构建试剂盒方法,构建其中肠 cDNA 表达文库,该文库滴度为 1.9×10^{6} pfu/mL,重组率为 99.97%。依据现代免疫学原理,利用棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 围食膜蛋白多克隆抗体筛选文库,得到两个编码华北大黑鳃金龟围食膜蛋白的 cDNA 克隆 *Ho-Peritrophin1* 与 *Ho-Peritrophin2*,其 cDNA 长分别为 2 385 bp 和 1 633 bp,在 polyA 末端上游各有 3 个多聚腺苷酸信号序列 AATAAA,最长开放阅读框(ORF)分别编码 729 个和 477 个氨基酸,与粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* CBP2(chitin binding protein 2)的相似性最高,分别为 21.9% 和 19.1%。结构域分析表明,*Ho-Peritrophin1* 与 *Ho-Peritrophin2* 分别具有 9 个和 6 个几丁质结合功能域,只含有较少的 O-糖基化位点,不含有类粘蛋白结构域。胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶对两种蛋白的作用位点主要位于几丁质结合功能域(chitin binding domain, CBD)内部,而因受几丁质结合功能域保护,这两种蛋白能够抵抗这些蛋白酶的降解。与正常 CBD 比较,这两种蛋白 C 端的 CBD 只含有 4 个 Cys,只在第 1 与第 3、第 4 与第 5 个 Cys 之间形成两对二硫键,缺少由第 2 与第 6 个 Cys 形成的二硫键。推测其 N 端还应包括信号肽序列和几丁质结合功能域的未知序列。

关键词: 华北大黑鳃金龟; 中肠; cDNA 表达文库; 围食膜蛋白; 序列分析
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)01-10-07

Molecular cloning and sequencing of cDNAs of two peritrophic membrane proteins from *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Melolonthidae)

ZHOU Hong-Xu[1,2], TAN Xiu-Mei[2], LI Chang-You[2], WANG Jun-Ping[2], SUN Xu-Gen[1,*], GUO Wei[3], LI Guo-Xun[2,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. College of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; 3. Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Peritrophic membrane (PM) proteins of a coleopteran insect *Holotrichia oblita* were studied by constructing a *H. oblita* larval midgut cDNA expression library with the cDNA Synthesis Kit of Stratagene Company and screening with a PM protein polyclonal antiserum from *Helicoverpa armigera* according to the theory of modern immunology. The titer of the primary cDNA expression library was 1.9×10^{6} pfu/mL and the recombination rate was 99.97%. Two positive cDNA clones named *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2*, with the sizes of 2 385 and 1 633 bp, were screened and sequenced from the library, respectively. The longest open reading frame of *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2* coded for 729 and 477 amino acids respectively, both of which showed the highest similarity to CBP2 of *Trichoplusia ni*, though their similarities to the latter were only 21.9% and 19.1%, respectively. *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2* contained nine and six chitin binding domains (CBDs) respectively with a little O-linked glycosylation sites and no mucin-like domain was found in the two protein sequences. The cleavage sites of trypsin and chymotrypsin are mainly located inside CBDs of the *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2*, but the two proteins are protected by the intradomain disulfide bonds, so they can resist the enzymes and

---

基金项目:国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2009CB118902);山东省自然科学基金项目(Y2007D69)
作者简介: 周洪旭,男,1968 年生,山东莱阳人,副教授,主要从事害虫生物防治和综合治理的研究工作,E-mail: hxzhou@qau.edu.cn
* 通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: xgsun@sdau.edu.cn; gxli@qau.edu.cn
收稿日期 Received: 2008-10-20; 接受日期 Accepted: 2008-12-17

exert physiological function in the midgut. Compared with the normal CBD, the CBD of carboxylic terminal of the two proteins contains only four cysteines, which form two pairs of disulfide bonds between the 1st and 3rd cysteines and the 4th and 5th cysteines, lacking the one between the 2nd and 6th cysteines. It is inferred that there are one signal peptide and unknown CBDs in the N end of *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2* respectively and these require further study.

Key words: *Holotrichia oblita*; midgut; cDNA expression library; peritrophic membrane (PM) proteins; sequence analysis

围食膜(peritrophic membrane, PM)是位于昆虫消化道内侧、包裹食物的一层厚薄均匀的长管状薄膜,具有保护中肠上皮细胞、阻止有害物质进入和帮助消化等多种功能(Lehane, 1997; Tellam and Eisemann, 2000 ; Bolognesi *et al.*, 2001),它主要由蛋白质、糖和几丁质组成,PM 蛋白有众多几丁质结合功能域,与几丁质以共价或非共价键形式结合成致密的网状结构(Wang and Granados, 2001)。迄今为止,人们已经对鳞翅目(粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 等)、双翅目(铜绿蝇 *Lucilia cuprina*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等)、直翅目(飞蝗 *Locusta migratoria* 等)、蜚蠊目(美洲大蠊 *Periplaneta amencana*)等昆虫的 PM 蛋白进行了相关研究,发现了近 20 种 PM 蛋白(Shen and Jacobs-Lorena, 1998; Sarauer *et al.*, 2003; Tellam *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005),它们具有不同的几丁质结合活性,这对于保护 PM、防止病原物侵入中肠、促进昆虫消化食物并维持 PM 结构具有重要作用。目前,人们已经发现了多种生物防治促进因子如昆虫病毒增效蛋白、几丁质酶、荧光增白剂和外源凝集素等,它们通过与 PM 上特异位点的结合,破坏 PM 结构,促进病原微生物对害虫的感染(Wang and Granados, 2001;郭慧芳等,2003)。因此,PM 成为害虫生物防治的潜在的新靶标。

金龟子(幼虫俗称蛴螬)是鞘翅目昆虫中庞大的类群之一,也是国内外公认的难防治的土栖性害虫。据近 20 年来的大量调查,其危害已居各类地下害虫之首,占地下害虫总虫量的 80% 以上(冯书亮和任国栋,2005),严重危害花生、甘薯等作物,造成大面积减产,部分地块减产 50% 以上,有的地块甚至绝收(王丙丽和王洪亮,2006)。蛴螬在土中取食植物地下部分,并把周围的土壤颗粒、病原微生物等物质一同带入消化道中,因此 PM 对蛴螬的生长发育具有重要的作用。研究蛴螬 PM 蛋白的结构功能,对于以 PM 为害虫生物防治的新靶标具有重要意义。本研究室对华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* PM 的结构和组成进行了研究,发现其 PM 韧性较差,是一类独特的 PM(李帅等,2008),本文在此基础上以华北大黑鳃金龟为材料通过中肠 cDNA 文库的构建和筛选,来研究鞘翅目昆虫 PM 蛋白,对于明确 PM 结构和功能,完善昆虫 PM 理论,并以蛴螬 PM 蛋白为靶标研制新的蛋白杀虫剂具有重要的意义。

1　材料和方法

1.1　试虫与试剂

1.1.1　供试昆虫:本实验室饲育的华北大黑鳃金龟 3 龄幼虫。

1.1.2　试剂及培养基: Oligotex mRNA Kit 和 RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司, ZAP-cDNA® Synthesis Kit 和 ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit 购自 Stratagene 公司。

棉铃虫 PM 蛋白多克隆抗体由本实验室自行制备, anti-rabbit IgG (alkaline phosphatase conjugate antibody developed in goat)(Sigma)购自博士德生物工程有限公司。

培养基: LB Broth, LB Agar, NZY Broth, NZY Agar, NZY To PAgar, LB with Supplements 参见 ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit 说明书。

1.2　华北大黑鳃金龟中肠组织总 RNA 和 mRNA 的提取

解剖华北大黑鳃金龟 3 龄幼虫的消化道,放入 RSS 缓冲液(Rinaldini's solution)内,小心除去马氏管、PM 及其肠内容物,将中肠装入 1.5 mL 离心管中,参照 RNeasy Mini Kit 说明书提取总 RNA,经电泳检测后,参照 Oligotex mRNA Mini Kit 的说明书获得并纯化 mRNA。

1.3　cDNA 的合成

参照 cDNA Synthesis Kit 说明书,完成 cDNA 的合成。在合成 cDNA 的第一链和第二链后分别用 1.1% TBE 琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 第一、二链的

分子量大小。然后加 *Eco*R Ⅰ 接头,用 *Xho* Ⅰ 酶切,经过 CL-2B 凝胶柱层析,收集 cDNA 片段。

1.4 cDNA 与 λ 噬菌体载体连接、体外包装和文库的扩增

按照 ZAP-cDNA Synthesis Kit 的说明,在 T_4DNA 连接酶作用下,将已定量的 cDNA 定向连接到经 *Xho* Ⅰ / *Eco*R Ⅰ 消化的 Uni-ZA PXR 载体上,12℃反应过夜。按试剂盒说明方法进行体外包装,感染大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 细胞,最后进行滴度测定,蓝白斑筛选以及文库扩增。

1.5 cDNA 文库的筛选

参照 *pico* Blue™ Immunoscreening Kit (Stratagene, La Jolla, CA)操作手册,用棉铃虫 PM 蛋白多克隆抗体从 cDNA 表达文库中筛选 PM 蛋白基因 cDNA 克隆。第一轮筛选按照每 15 cm 培养皿有 50 000 个左右噬菌斑进行高密度筛选,然后选取阳性噬菌斑进行第二轮低密度的筛选,使每 9 cm 培养皿有 100 个左右噬菌斑,最后选取第二轮筛选的阳性噬菌斑,依据 ZAP-cDNA Gigapack Cloning Kit 操作步骤,应用 ExAssist® Interference-resistant Helper Phage 将 pBluescript® SK(-) phagemid 进行切除。

1.6 DNA 的测序及序列分析

将选取的 cDNA 阳性克隆按碱抽提法提取质粒,用 *Xho* Ⅰ / *Eco*R Ⅰ 限制性内切酶进行切割,鉴定插入片段的大小,并进行限制性酶切分析,选取酶切产物不同的克隆由上海生工进行 T3 和 T7 引物双向测序。使用 DNAMAN 软件包和 BLAST 数据库搜索程序进行 DNA 和氨基酸序列分析,进化树构建和数据库搜索。结构域分析使用 http://www.expasy.org/prosite/(Shi *et al.*, 2004),糖基化位点预测使用 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc 1.0/; http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc3.1/。

2 结果与分析

2.1 肠 cDNA 文库的构建

应用 RNeasy Mini Kit 和 Oligotex mRNA Mini Kit 成功提取了华北大黑鳃金龟中肠组织总 RNA 和 mRNA,利用 cDNA Synthesis Kit 合成的 cDNA 第一链大小为 700 ~ 10 000 bp,cDNA 第二链主要分布在 300 ~ 4 500 bp,在 600 ~ 2 000 bp 处 cDNA 亮度较高呈弥散状条带。经体外包装得到初级 cDNA 文库平均滴度为 1.9×10^6 pfu/mL,蓝白斑测定重组率为 99.97%,文库扩增后滴度为 1.4×10^9 pfu/mL。

2.2 PM 蛋白 cDNA 克隆的筛选

利用棉铃虫 PM 蛋白多克隆抗体,筛选华北大黑鳃金龟中肠 cDNA 表达文库,获取 168 个阳性克隆,用 Helper Phage 进行体外切除、测序。将获得的序列通过 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/balst)进行相似性分析。筛选得到两个克隆,分别命名为 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2*,其插入片段分别为 2 385 和 1 633 个碱基,含终止密码子 TAA。*Ho-Peritrophin1* 与 *Ho-Peritrophin2* 分别在 polyA 末端上游 10,67,78 bp 以及 11,68,79 bp 处各有一个多聚腺苷酸信号序列 AATAAA,这与 *TnIIM22* 的多聚腺苷酸信号序列相同(Wang and Granados, 1997)。*Ho-Peritrophin1* 最长开放阅读框(ORF)编码 729 个氨基酸,在所有已发现的 PM 蛋白中与粉纹夜蛾 CBP2 相似性最高,为 21.9%,其核酸序列在 GenBank 登录号为 FJ393548;*Ho-Peritrophin2* 最长开放阅读框编码 477 个氨基酸,在所有已发现的围食膜蛋白中与粉纹夜蛾 CBP2 相似性最高,为 19.1%,其核酸序列在 GenBank 登录号为 FJ393549 (图 1)。

2.3 Ho-Peritrophin 几丁质结合功能域及其糖基化位点分析

结构域分析表明 *Ho-Peritrophin1* 具有 9 个几丁质结合功能域(chitin binding domain, CBD),*Ho-Peritrophin2* 具有 6 个 CBD,分别被由 22 ~ 28 个氨基酸组成的间隔区(spacer)分开,N 端未发现信号肽。在 *Ho-Peritrophin1* 的 1 ~ 8 个 CBD 以及 *Ho-Peritrophin2* 的 1 ~ 5 个 CBD 中,每个 CBD 长约 57 ~ 60 个氨基酸,且含有 6 个保守的半胱氨酸(Cys)残基,按照 Shen 和 Jacobs-Lorena(1999)的预测模型,在第 1 与第 3、第 2 与第 6、第 4 与第 5 之间的 Cys 分别形成 3 对二硫键,以维持 PM 蛋白的稳定性。其序列可以用通式 $CX_{13,16}$ CX_5 CX_9 CX_{12} CX_7 C 表示(图 2),这与绿蝇 *Lucilia cuprina* 的 peritrophin-44 和 peritrophin-48 的保守功能域 CX_{13-20} CX_{5-6} CX_{9-19} CX_{10-14} CX_{4-14} C 类似(Tellam *et al.*, 1999),与粉纹夜蛾的 CBP1 和 CBP2 以及蓓带夜蛾 *Mamestra configurata* McPM1 的保守功能域 CX_{14-15} CX_5 CX_9 CX_{12} CX_7 C 几乎等同(Shi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004),不同之处是 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 的第 1 个与第 2 个 Cys 之间分别有 13 和 16 个氨基酸残基,而 CBP1、CBP2 以及 McPM1 的第 1 个与第 2 个 Cys 之间有 14 或 15 个氨基酸残基。

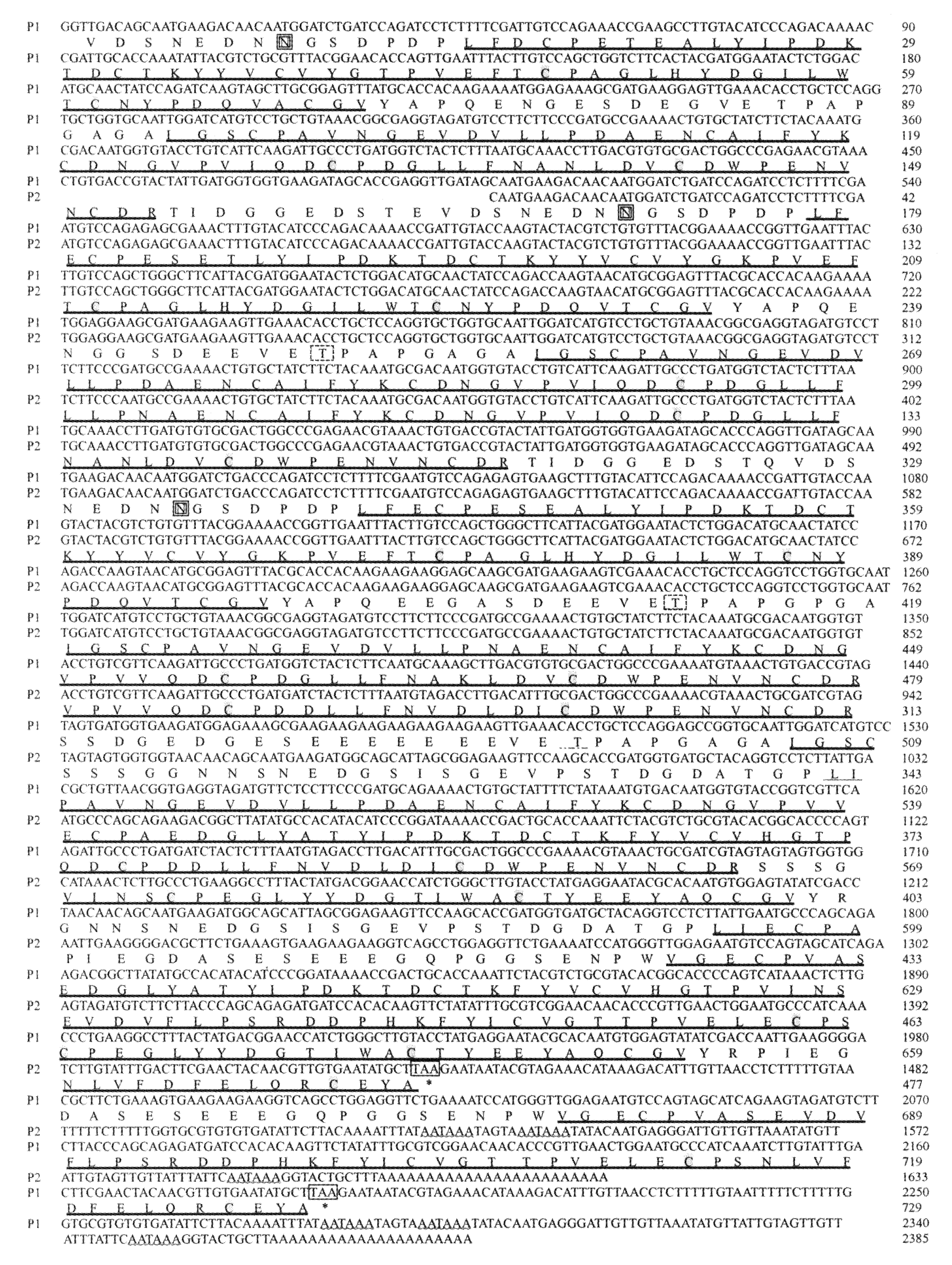


图 1　*Ho-peritrophin1* 与 *Ho-peritrophin2* cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide sequences of the cDNA for *Ho-peritrophin1* and *Ho-peritrophin2* and their deduced amino acid sequences

P1 表示 *Ho-Peritrophin1*；P2 表示 *Ho-Peritrophin2*。多聚腺苷信号序列为波浪线所示；终止密码子在实方框内显示；几丁质结合功能域为下划线所示；二硫键以灰色背景所示；N-糖基化位点为双方框内字体所示；*Ho-Peritrophin1* 的 O-糖基化位点为虚线所示，*Ho-Peritrophin2* 的 O-糖基化位点在虚方框内显示。图 4 同。P1 indicates *Ho-Peritrophin1* and P2 indicates *Ho-Peritrophin2*. The potential polydenylation signal sequence is indicated by wave line. The translation stop codon is indicated by the solid box. The chitin-binding domains are underlined. Disulphide bond regions within the chitin-binding domains are presented as grey background. The putative N-glycosylation sites are indicated in double-line boxes and the putative O-glycosylation site of *Ho-Peritrophin1* is indicated in broken line and the putative O-glycosylation site of *Ho-Peritrophin2* is indicated by the dotted box. The same for Fig. 4.

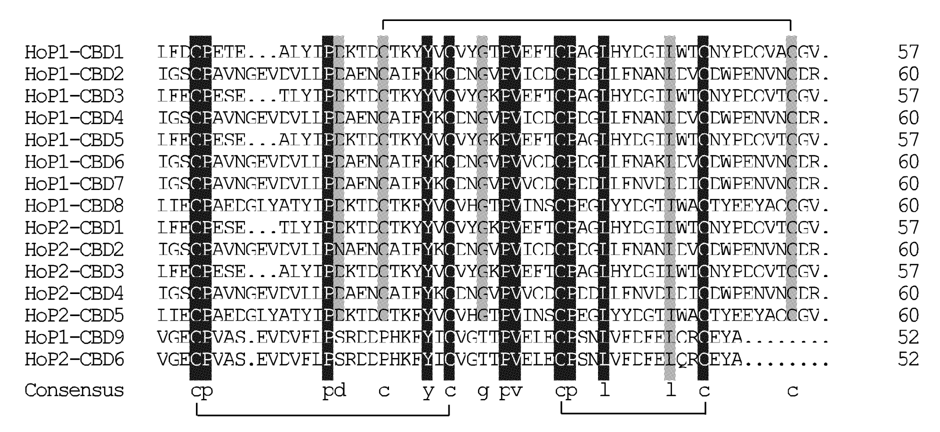


图 2 *Ho-Peritrophin1* 与 *Ho-Peritrophin2* 几丁质结合功能域分析

Fig. 2 Analysis of the CBDs of *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2*

图中 HoP1 和 HoP2 分别指 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2*。HoP1 and HoP2 in the figure indicate *Ho-Peritrophin1* and *Ho-Peritrophin2*, respectively.

Ho-Peritrophin1 的第 9 个 CBD 与 *Ho-Peritrophin2* 的第 6 个 CBD 氨基酸排列完全相同,与其余几个 CBD 比较发现,都只含有 4 个 Cys,这与已报道的由 6 个保守的 Cys 组成的几丁质结合功能域明显不同,它们只含有第 1,3,4,5 个 Cys,缺少第 2 和第 6 个 Cys,因此与由 6 个 Cys 组成的几丁质结合功能域相比,这类 CBD 缺少了由第 2 与第 6 个 Cys 形成的二硫键,只在第 1 与第 3、第 4 与第 5 个 Cys 之间形成两对二硫键。

糖基化位点分析表明(图 1),*Ho-Peritrophin1* 在第 1 个 CBD 上游 Asn_8 处,第 2 个 CBD 与第 3 个 CBD 之间的间隔区序列 Asn_{171} 处,第 4 个 CBD 与第 5 个 CBD 之间的间隔区序列 Asn_{334} 处各有一个 N-联糖基化位点 DNNG,*Ho-Peritrophin2* 在第 1 个 CBD 上游 Asn_5 处,第 2 个 CBD 与第 3 个 CBD 之间的间隔区序列 Asn_{168} 处各有一个 N-联糖基化位点 DNNG。*Ho-Peritrophin1* 在第 5 个 CBD 与第 6 个 CBD 之间的间隔区序列 Thr_{412} 处,第 6 个 CBD 与第 7 个 CBD 之间的间隔区序列 Thr_{498} 处,各有一个 O-联糖基化位点,*Ho-Peritrophin2* 在第 1 个 CBD 与第 2 个 CBD 之间的间隔区序列 Thr_{83} 处,第 3 个 CBD 与第 4 个 CBD 之间的间隔区序列 Thr_{246} 处,各有一个 O-联糖基化位点。

对 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 蛋白酶切位点分析发现,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用位点主要位于 CBD 内部,其 CBD 的间隔区几乎没有发现带电氨基酸(精氨酸和赖氨酸)和极性氨基酸(组氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸),这与 McPM1 的特点基本相似(Shi *et al.*, 2004),只是在 *Ho-Peritrophin1* 的 CBD 的间隔区发现 4 个酪氨酸和 2 个色氨酸,在 *Ho-Peritrophin2* 的间隔区发现 3 个酪氨酸和 2 个色氨酸,这些带电氨基酸和极性氨基酸都是胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用位点。因此在 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 中虽然有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用位点,但这些酶切位点被几丁质结合功能域包围,而免受中肠蛋白酶的降解,这对于 PM 蛋白在富含蛋白酶的中肠环境中发挥其功能是非常重要的。

2.4 Ho-Peritrophin 与已知 PM 蛋白 CBD 间的保守性分析及聚类分析

利用 DNAMAN 对 Ho-peritrophin1 前 8 个 CBD、Ho-peritrophin2 前 5 个 CBD 与 TnIIM22, McPM1, TnCBP1, TnCBP2, SfPM1 的 CBD 的 cDNA 序列比对分析发现,它们都含有 6 个保守的 Cys(结果未列出)。聚类分析结果表明(图 3),15 种 PM 蛋白可以聚为 3 类,埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 4 种粘蛋白因是同一种昆虫的,相似性最高,聚类在一起;粉纹夜蛾、蓓带夜蛾和甜菜夜蛾 3 种鳞翅目的 5 种粘蛋白聚类在一起; *Ho-Peritrophin1*、*Ho-Peritrophin2* 与 McP1, TnCBP1, TnCBP2 和 SfP1 这 6 种 PM 蛋白中只含有几丁质结合功能域,没有粘蛋白结合功能域,相似性最高,聚类在一起,然后与埃及伊蚊的 4 种粘蛋白聚类在一起。

3 讨论

本研究成功构建了华北大黑鳃金龟的中肠 cDNA 表达文库,用棉铃虫围食膜蛋白抗体进行文库

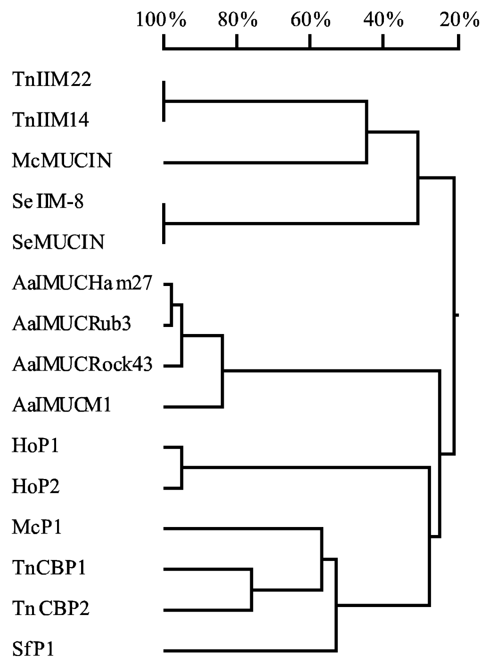


图 3　Ho-Peritrophin1、Ho-Peritrophin2 与几种 PM 蛋白的聚类分析

Fig. 3　The clustering analysis of Ho-Peritrophin1, Ho-Peritrophin2 and other PM proteins

TnIIM22：粉纹夜蛾肠粘蛋白 *Trichoplusia ni* insect intestinal mucin IIM22；TnIIM14：粉纹夜蛾肠粘蛋白 *T. ni* insect intestinal mucin IIM14；McMUCIN：蓓带夜蛾肠粘蛋白 *Mamestra configurata* insect intestinal mucin；SeIIM-8：甜菜夜蛾肠粘蛋白 *Spodoptera exigua* insect intestinal mucin IIM-8；SeMUCIN：甜菜夜蛾肠粘蛋白 *S. exigua* intestinal mucin；AaIMUCHam27：埃及伊蚊围食膜类粘蛋白 IMUCHam27 *Aedes aegypti*-clone IMUCHam27 mucin-like peritrophin；AaIMUCM1：埃及伊蚊围食膜类粘蛋白的蛋白 IMUCM1 *A. aegypti*-strain MOYO-R mucin-like protein；AaIMUCRock43：埃及伊蚊围食膜类粘蛋白 IMUCRock43 *A. aegypti*-clone IMUCRock43 mucin-like peritrophin；AaIMUCRub3：埃及伊蚊围食膜类粘蛋白 IMUCRub3 *A. aegypti*-clone IMUCRub3 mucin-like peritrophin；HoP1：华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* peritrophin 1；HoP2：华北大黑鳃金龟 *H. oblita* peritrophin 2；McP1：蓓带夜蛾 *M. configurata* peritrophin 1；TnCBP1：粉纹夜蛾 *T. ni* CBP1；TnCBP2：粉纹夜蛾 *T. ni* CBP2；SfP1：草地贪夜蛾围食膜蛋白 1 *Spodoptera frugiperda* peritrophin membrane protein 1.

筛选，是因为华北大黑鳃金龟难饲养，围食膜弹性差，易破碎，因此解剖华北大黑鳃金龟围食膜时，破碎的围食膜与土壤颗粒混在一起，很难获得大量干净的围食膜。笔者在实验过程中，也曾制备华北大黑鳃金龟围食膜蛋白抗体，但制备的抗体不纯，效价低。用本实验室已制备的棉铃虫围食膜蛋白抗体与华北大黑鳃金龟围食膜蛋白 Western blot 结果表明两者有交叉反应（结果未列出），因此本研究用棉铃虫围食膜蛋白抗体筛选了华北大黑鳃金龟中肠 cDNA 文库。

应用 BLAST 比对发现，*Ho-Peritrophin1* 与粉纹夜蛾 CBP2 相似性为 21.9%，期望值 E 值为 9×10^{-79}，*Ho-Peritrophin2* 与粉纹夜蛾 CBP2 相似性为 19.1%，E 值为 1×10^{-55}。E 值表示由随机情况产生的比对匹配结果达到相同位计分时的次数，E 值越低（即越接近于 0），意味着序列之间的相似性越大，且目标序列与查询序列具有同源性这一论断越可信，一般 E 值小于 10^{-4}，可认为目标序列与查询序列属于同源物。本研究中 *Ho-Peritrophin1*，*Ho-Peritrophin2* 与粉纹夜蛾 CBP2 的 E 值均非常接近于 0，说明 *Ho-Peritrophin1*，*Ho-Peritrophin2* 与粉纹夜蛾 CBP2 的同源性很高，而相似性相对较低，说明 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 是两种新型的 PM 蛋白。

糖基化对于 PM 蛋白在富含蛋白酶的中肠环境中发挥保护功能具有重要生理意义。多聚糖侧链通过糖基化位点与 PM 蛋白结合形成高度伸展缠绕结构，以保护 PM 蛋白不被中肠蛋白酶降解（Wang and Granados, 1997）。*Ho-Peritrophin1*，*Ho-Peritrophin2* 含有 2～3 个 N-联糖基化位点，不象粘蛋白那样含有丰富的 O-联糖基化位点，只含有 2 个 O-联糖基化位点。这种含有少量糖基化位点的 PM 蛋白，之所以能够在富含蛋白酶的中肠环境中发挥生理功能，这可能是因为：(1) CBD 的间隔区不含有或只含有极少的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用位点；(2) 位于 CBD 内部的酶作用位点受到 CBD 内部二硫键的保护，而减少了其暴露于中肠蛋白酶的机会；(3) PM 蛋白与几丁质的紧密结合进一步避免了蛋白酶对 PM 蛋白的降解（Wang *et al.*, 2004）。因此蛋白酶作用位点主要位于 CBD 内部以及具有多几丁质功能域可能是缺少粘蛋白功能域的 PM 蛋白能够在富含蛋白酶的环境中发挥作用的一种重要机制。

到目前为至，已鉴定的几种昆虫 PM 蛋白可以分为 3 类，第 1 类既含有多几丁质结合功能域（CBD），也含有粘蛋白结构域（mucin domain），如 TnIIM22，TnIIM14，McMUC1 和 SeIIM-8；第 2 类只含有多几丁质结合功能域，如 CBP1，CBP2 和 McPM1；第 3 类具有与几丁质脱乙酰酶相似的功能域（chitin deacetylase-like domain）如 TnPM-P42（Wang *et al.*, 1997, 2004；Shi *et al.*, 2004；Guo *et al.*, 2005）。本文首次在鞘翅目昆虫发现了 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 两种 PM 蛋白，只含有多几丁质结合功

能域,不含有粘蛋白结构域,因此属于第 2 类 PM 蛋白,但与以往发现的第 2 类 PM 蛋白有所不同:(1)粉纹夜蛾 CBP1、CBP2 和蓓带夜蛾 McPM1 的一个明显特点是在 McPM1 每一个 CBD 上游的第 9 和第 11 位置上都有一个 Cys,其通式是 C^{11} NC^{9}(N/D)PXEAPXIcys$_1$,CBP1、CBP2 在部分 CBD 的上游也有 1~2 个额外的 Cys,这些额外的 Cys 可能在发挥 CBD 的几丁质结合活性时起重要作用,或有助于多个 CBD 通过分子内二硫键在几丁质纤丝上的定位(Shi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004);而 *Ho-Peritrophin1*、*Ho-Peritrophin2* 的 CBDs 上游并没有发现额外的 Cys;(2)几丁质结合功能域一般由 6 个保守的 Cys 组成,并在功能域内部形成 3 对二硫键,另外在绿蝇 peritrophin-30 和 peritrophin-55 中含有包括 8 个 Cys 的 peritrophin-B 几丁质结合功能域(Tellam *et al.*, 1999)。而本研究中发现的两种 PM 蛋白羧基端的 CBD 只含有 4 个 Cys,恰好缺少了第 2、第 6 个 Cys,只在第 1 与第 3、第 4 与第 5 个 Cys 之间形成两对二硫键,尚未知这种 CBD 与由 6 个或 8 个 Cys 组成的 CBD 功能作用是否有差异。华北大黑鳃金龟 PM 蛋白韧性差、易碎的特点是否与以上两个特点有关,有待于进一步研究。

本文筛选到的 *Ho-Peritrophin1* 和 *Ho-Peritrophin2* 两基因是一类新型基因,但均未检测其 5′端。下一步工作将利用 Clontech 的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit,设计特异性引物,进行 5′RACE,对两个围食膜蛋白基因进行 5′端基因的扩增,以获得其全长 cDNA;另一方面将继续制备华北大黑鳃金龟围食膜蛋白抗体,筛选其全长 cDNA,进行功能研究。

参 考 文 献(References)

Bolognesi R, Ribeiro AF, Terra WR, 2001. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2): 62 – 75.

Feng SL, Ren GD, 2005. *Bacillus thuringiensis* HBF-1 and Its Application of Management to Harmful Scarabaeoid Beetles. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 1 – 2. [冯书亮,任国栋,2005. 苏云金芽孢杆菌 HBF-1 及其在有害金龟治理中的应用. 北京:中国农业科学技术出版社. 1 – 2]

Guo HF, Fang JC, Han ZJ, 2003. Advances in insect virus synergists. *Acta Entomologica Sinica*, 46 (6): 766 – 772. [郭慧芳, 方继朝, 韩召军, 2003. 昆虫病毒增效剂研究进展. 昆虫学报, 46 (6): 766 – 772]

Guo W, Li GX, Pang Y, Wang P, 2005. A novel chitin binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1 224 – 1 234.

Lehane MJ, 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 525 – 550.

Li S, Li SW, Li CY, Zhou HX, Li GX, 2008. Preliminary study on structure of peritrophic membrane (PM) from *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 23 (4): 55 – 59. [李帅,李淑文,李长友,周洪旭,李国勋, 2008. 鞘翅目害虫——华北大黑鳃金龟围食膜结构的初步研究. 华北农学报,23(4): 55 – 59]

Sarauer BL, Gillott C, Hegedus D, 2003. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 12(4): 333 – 343.

Shen ZC, Jacobs-Lorena M, 1998. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28): 17 665 – 17 670.

Shen ZC, Jacobs-Lorena M, 1999. Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 341 – 347.

Shi XZ, Chamankhah M, Visal-Shah S, Hemmingsen SM, Erlandson M, Braun L, Alting-Mees M, Khachatourans GG, O'Grady M, Hegedus DD, 2004. Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix: Characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 1 101 – 1 115.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 87 – 101.

Tellam RL, Eisemann C, 2000. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1 189 – 1 201.

Tellam RL, Vuocolo T, Eisemann C, 2003. Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 239 – 252.

Wang P, Granados RR, 1997. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26): 16 663 – 16 669.

Wang P, Granados RR, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47: 110 – 118.

Wang P, Li GX, Granados RR, 2004. Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: Structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 215 – 227.

Wang BL, Wang HL, 2006. Outbreak cause and integrated management of grubs in peanut fields. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 7: 66 – 68. [王丙丽,王洪亮,2006. 花生田蛴螬的成灾原因及综合治理. 河南农业科学,7: 66 – 68]

(责任编辑:邓艳)